

环孢霉素和供体脾细胞门静脉接种延长小鼠心脏移植存活

周海宽¹袁立新²袁邵少斌¹袁志廉³袁未有华³第一军医大学南方医院¹泌尿外科袁肾移植科袁广东广州510515白第二军医大学长征医院泌尿外科袁上海200003冤

摘要目的 探讨同种异系抗原门静脉接种和环孢霉素 A(CsA)对同种异系间小鼠心脏移植存活期的影响遥方法 无菌条件下取出 NIH/q 新生小鼠渊出生 24 h 内冤的心脏袁行 BALB/C 小鼠耳后皮下移植遥移植前 1 周袁先用 NIH/q 小鼠脾细胞或用与供受体无关的 C57BL/6 小鼠脾细胞行受体小鼠门静脉或腔静脉接种袁同时给予小剂量 CsA 渊 4 mg/kg 渊 0.1 w 冤喂服 渊渊前 7 d~ 术后 5 d 冤遥观察各组移植物的存活时间遥结果 供体脾细胞门静脉接种加 CsA 组移植物存活时间为渊1.00 依 0.23 冤d 袁较其他各组显著延长渊渊=6 袁 P<0.05 冤遥单纯门静脉接种组和单纯 CsA 组移植物存活时间分别为渊6.11 依 1.97 冤和渊8.50 依 0.59 冤d 袁较对照组[渊1.71 依 0.50 冤]显著延长渊渊<0.05 冤遥供体脾细胞经腔静脉接种以及与供受体无关的 C57BL/6 小鼠脾细胞门静脉接种对移植物存活时间无显著影响渊渊>0.05 冤遥结论 供体脾细胞门静脉接种和 CsA 对延长同种异系小鼠心脏移植存活时间有协同作用袁其作用具有抗原特异性遥

关键词 环孢霉素 A 心脏移植 门静脉 脾 / 细胞学 移植物存活

中图分类号 院 R392.2;R654.2;R979.5 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588(2002)12-1093-03

Cyclosporin and portal venous inoculation of donor splenocytes prolongs cardiac allograft survival in mice

ZHOUHai-kuan¹, YULi-xin², ZHENGShao-bin¹, MINZhi-lian³, ZHUYou-hua³

Department of Urology¹, Department of Kidney Transplantation², Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ³Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Abstract: Objective To investigate the effect of portal venous inoculation of donor splenocytes combined with cyclosporin A (CsA) administration on cardiac allograft survival in mice. Methods Heterotopic cardiac transplantation between fully allogenic NIH/q and BALB/C strain mice was performed. A modified procedure of neonatal heart-in-ear transplantation, as originally described by Fulmer et al, was adopted. We prepared donor splenocytes from NIH/q or third-party C57BL/6 spleens for BALB/C recipients, which were injected preoperatively via the recipient portal vein or the systemic vein 1 week before the heart-in-ear transplantation. The recipients were subsequently treated with a short course of the immunosuppressive agent, CsA (4 mg/kg starting from 7 d before the operation till 15 d after it). Results Portal venous inoculation of donor splenocytes combined with CsA significantly prolonged cardiac grafts survival (n=6, P<0.05) that reached 31.00 依 0.23 d, and 2 of the 6 allografts survived for more than 35 d. Donor splenocytes injected via the systemic vein or third-party C57BL/6 mice splenocytes injected via the portal vein did not prolong grafts survival (P>0.05). CsA alone or portal venous inoculation of donor-specific splenocytes alone also prolonged grafts survival (P<0.05), with mean grafts survival time of 18.50 依 0.59 d and 16.11 依 0.97 d respectively. Conclusion Combination of portal venous inoculation of donor-specific splenocytes and CsA can prolong murine cardiac allograft survival, which is donor antigen-specific.

Key words: cyclosporine; heart transplantation; portal vein; spleen/cytology; grafts survival

已有研究证实袁同种异系抗原预先经门静脉接种可诱导受体产生对该抗原的特异性免疫抑制袁使随后接受的器官移植物存活时间延长遥新一代免疫抑制剂如环孢霉素 A(CsA)可有效抑制同种异系动物间器官移植后引起的排斥反应袁延长移植物存活时间遥本研究旨在探讨小剂量 CsA 对同种异系抗原门静脉接种延长心脏移植存活时间的协同作用遥

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

雌性 BALB/C 尧 NIH/q 尧 C57BL/6 小鼠袁袁 10 周龄袁袁 质量 20~25 g 渊出生 24 h 内冤的 NIH/q 小鼠袁袁 普通级遥上述动物购自第二军医大学实验动物中心遥 CsA 口服液为杭州华东制药厂产品遥

1.2 脾细胞的分离

无菌条件下取出 NIH/q 尧 C57BL/6 小鼠脾脏袁袁 剪碎后经不锈钢网过滤袁袁 H₂O₂ 溶液处理去除红细胞袁袁 Hanks 液中洗涤后离心袁袁 调整细胞浓度为 2 伊 10¹⁰/L 遥

1.3 脾细胞门静脉接种和腔静脉接种方法

收稿日期 院 002-04-03

作者简介 院 周海宽 渊 1963 冤 袁 男 袁 浙江宁海人 袁 2000 年毕业于第二军医大学 袁 袁 主治医师 袁 电话 院 20-61641799

BALB/C 小鼠用 0.7% 质量分数的戊巴比妥钠按 0.05mg/kg 体重腹腔注射麻醉腹壁消毒后切开通向左侧翻开小肠暴露肠系膜上静脉或下腔静脉用 5 号针头穿刺注入 0.5 ml 分离的小鼠脾细胞 10⁷/ml 然后迅速拔出针头盐水纱球压迫 1~2min 止血后关闭腹腔

1.4 耳后心脏移植术

BALB/C 小鼠麻醉后耳廓消毒于耳廓背侧中线之下 1/3 处作一 3~4mm 的横切口损伤耳廓静脉持眼科剪向耳尖方向钝性分离皮下组织成一 3~4mm 的囊腔新生供鼠经皮肤消毒后剖胸摘取心脏离体心脏置于无菌 Hanks 液内搏动 1~2 次以排空心腔内余血持眼科镊将移植体轻柔地填入受鼠耳后移植床内切口缝合一针用手指轻按局部使移植体与移植床之周围组织贴紧

1.5 结果判断

自术后第 6 天起每天记录移植心脏的心电图凡术后第 8 天尚不能测出心电图的鼠后也不会有心电活动定为移植手术失败在手术成功者中若心电图上心电活动消失时定为排斥反应的终点

1.6 实验分组

A 组 7 只单纯心脏移植作为对照组 B 组 9 只心脏移植前 1 周预先用与供体小鼠同品系的 NIH/q 小鼠脾细胞 10⁷/0.5ml 行受体鼠门静脉接种 C 组 6 只门静脉接种方法同 B 组门静脉接种后当天至心脏移植后 5 d 喂 CsA 1mg/kg 体重 D 组 6 只单纯以 CsA 1mg/kg 体重于心脏移植后当天至心脏移植后 5 d 喂服 E 组 5 只心脏移植前 1 周预先用与供体鼠同系的 NIH/q 小鼠脾细胞 10⁷/0.5 ml 行受体鼠腔静脉接种 F 组 6 只腔静脉接种方法同 E 组腔静脉接种后当天至心脏移植后 5 d 喂 CsA 1mg/kg 体重 G 组 7 只 C57BL/6 小鼠脾细胞(2伊 0⁷/ml) 0.5ml 行受体小鼠门静脉接种术后行心脏移植

1.7 统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析及 Tamhane 多重比较方法

2 结果

结果见表 1 同种异系小鼠脾细胞预先经门静脉接种显著延长受体接受的与脾细胞供体同品系的小鼠心脏移植的存活时间而同种异系小鼠脾细胞经腔静脉接种对结果无显著影响与心脏移植体供体无关的第三品系小鼠脾细胞经门静脉接种对移植体存活时间也无显著影响应用 CsA 可显著延长同种异系间心脏移植的存活时间同种异系小鼠脾细胞门静脉接种加小剂量 CsA 治疗具有协同作用

表 1 环孢霉素 A 和供体脾细胞门静脉接种延长小鼠心脏移植存活

Tab.1 Portal venous inoculation of donor-specific splenocytes combined with CsA prolongs murine cardiac allograft survival

Group	n	Allograft survival time(d)	Mean SD
A	7	10,10,11,12,12,13,14	11.71±.50
B	9	14,14,15,15,15,17,17,19,19	16.11±.97*
C	6	28,28,30,30,35,35	31.00±.23*
D	6	16,17,17,18,20,23	18.50±.589*
E	7	10,10,10,12,12,13,13	11.43±.40
F	6	17,17,18,18,19,19	18.00±.89*
G	7	9,10,10,10,11,11,11	10.29±.76

*P<0.05 vs A, E and G group; *P<0.05 vs the other groups. CsA: Cyclosporin. A: Cardiac transplantation between NIH/q and BALB/C strain mice; B: Donor splenocytes injected preoperatively via the recipient portal vein; C: Donor splenocytes injected preoperatively via the recipient portal vein, the recipients being treated with a short course of the CsA; D: CsA administration, no donor splenocytes inoculation; E: Donor splenocytes injected preoperatively via the recipient systemic vein; F: Donor splenocytes injected preoperatively via the recipient systemic vein, the recipients being treated with a short course of the CsA; G: Third-party C57BL/6 splenocytes injected preoperatively via the recipient portal vein

3 讨论

1963 年 Fulmer 首先报道了小鼠同系新生及胚胎心脏耳后移植模型 1981 年国内首次报道并就新生鼠心脏移植的方法影响移植体存活的因素异系移植确定心脏排斥反应移植体死亡的客观标准等方面作了详细探讨我们选用出生后 24 h 内的新生鼠作为心脏移植的供体全部用全心移植移植手术成功率为 100% 本方法技术操作简便重复性好结果可靠移植手术不需要行血管吻合其适用于小鼠心脏异位移植的实验研究是同种异系移植研究的理想实验模型

在进行移植手术时我们有如下体会手术过程一定要严格遵守无菌操作耳后皮下腔隙大小要合适以免腔隙过大血肿形成影响移植体的存活过小则易对移植体造成挤压使移植体受到机械损伤在心脏摘取和填入耳后腔隙时动作一定要轻柔特别是在填入移植体时为防止钳子过分挤压心脏应当将耳后腔隙边缘皮肤提起将心脏轻轻放入然后在皮肤的外面轻轻地将其挤入腔隙内

多个作者通过对小动物如小鼠大鼠的实验研究确定同种异系抗原预先经门静脉接种可诱导受体产生对该抗原的特异性免疫耐受包括随后接触该抗原引起的迟发性超敏反应受到抑制和供受体之间混合淋巴细胞培养的增生反应受到抑制随后同系供体的皮肤或心脏移植的存活期延长 10 天 尽管导

致门静脉耐受这一现象的确切机制仍不清楚。但有实验表明肝脏内细胞对同种异系抗原的处理和递呈起主要作用。其中肝脏内 Kupffer 细胞对抗原的吞噬和处理起关键作用。由于门静脉和肝脏独特的解剖关系，经门静脉接种的同种异系抗原首先全部进入肝脏，被肝脏内的 Kupffer 细胞吞噬和处理。有作者认为 Kupffer 细胞作为抗原递呈细胞与 T 辅助细胞相互作用，主要刺激 Th1 细胞的产生。而肝脏以外的抗原递呈细胞处理异系抗原后，同时刺激 Th1 和 Th2 细胞的产生。其中 Th1 细胞对异系抗原引起的迟发性超敏反应有抑制作用。另外，由于肝脏内独特的生化环境，激活的 Kupffer 细胞释放具有免疫抑制活性的前列腺素 E₂，从而抑制效应性 T 淋巴细胞的反应。同种异系抗原在肝脏内的处理和递呈，可能诱导抑制性效应因子或抑制性效应细胞的产生。

本实验结果表明，同种异系抗原预先经门静脉接种，可使受体接受的与接种抗原同一品系的异系心脏移植存活时间显著延长。而同种异系抗原经腔静脉接种对移植存活时间无显著影响。与移植物供体无关的第三者抗原经门静脉接种对移植存活时间也无显著影响。这些说明同种异系抗原门静脉接种诱导的免疫耐受具有抗原特异性。CsA 是新一代的免疫抑制剂，其作用机制为可逆性地抑制白细胞介素 2 基因的转录，抑制 T 细胞的激活过程，从而抑制同种异系间组织和器官移植所引起的排斥反应。其免疫抑制作用在实验和临床研究及应用中均得到了证实。心脏移植前及术后应用 CsA 可使移植存活时间显著延长。本实验结果表明，单纯 CsA 治疗组较单纯门静脉接种组更具有免疫抑制作用。说明单纯门静脉接种不能完全有效地抑制同种异系间器官移植引起的排斥反应。而两者结合使用，可显著延长移植存活。

参考文献

张梅 T, Callery MP, Flye MW. Pretransplant portal venous

administration of donor antigen and portal venous allograft drainage synergistically prolong rat cardiac allograft survival. *Ann Surg*, 1990, 108(2):415-22.

张梅 Valentine H. Neoral use in the cardiac transplant recipient. *Ann Transplant Proc*, 2000, 32(s):s27-44.

张梅 史美浩, 马宝骊, 余贺. 小鼠耳后心脏/心肌组织移植模型之探讨. *上海免疫学杂志*, 1981, 1(3):41-5.

张梅 Qian JH, Hashimoto T, Fujiwara H, et al. Studies on the induction of tolerance to alloantigens. *Ann Immunol*, 1985, 134(6):3656-61.

张梅 Fukada J, Kurimoto Y, Phillip R, et al. Long-term survival of rat cardiac allografts by intrathymic plus portal venous injections of donor bone marrow cells and short-term tacrolimus immunosuppression. *Transpl Int*, 2001, 14(5):311-9.

张梅 张永法, 张楠伟, 杉浦喜久弥. 门脉注射异基因脾细胞诱导免疫耐受机制的研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1995, 15(1):27-31.

张梅 Magilavy DB, Fitch FW, Gajewski TF. Murine hepatic accessory cells support the proliferation of Th1 but not Th2 helper T lymphocyte clones. *Exp Med*, 1989, 170(3):985-90.

张梅 Ruessner RW, Kristine YZ, Michele D, et al. Bone marrow augmentation in kidney transplantation: a large animal study. *Transpl Int*, 2001, 14(3):159-69.

张梅 Shirahama M, Ishibashi H, Tsuchiya Y, et al. Kupffer cells may autoregulate interleukin 1 production by producing interleukin 1 inhibitor and prostaglandin E. *Scand J Immunol*, 1988, 28(6):719-25.

张梅 Meyer D, Otto C, Rummel C, et al. Tolerogenic effect of liver for small bowel allograft. *Transpl Int*, 2000, 13(s1):s123-6.

张梅 Meyer D, Lohler S, Otto C, et al. Donor-derived alloantigen-presenting cells persist in the liver allograft during tolerance induction. *Transpl Int*, 2000, 13(1):12-20.

张梅 Sano S, Suda T, Qian JH, et al. Abrogation of the capacity of delayed-type hypersensitivity responses to alloantigens by intravenous injection of neuraminidase-treated allogeneic cells. *Ann Immunol*, 1987, 139(11):3652-9.

张梅 Gassel HJ, Otto C, Klein I, et al. Analysis of cellular events in hepatic allografts: Donor progenitors induce intragraft chimerism. *Transpl Int*, 2000, 13(7):616-29.

张梅 Naudet P, Dudley J, Charbit M, et al. Pretransplant blood transfusions with cyclosporine in pediatric renal transplantation. *Pediatr Nephrol*, 2000, 14(6):451-6.

责任编辑 黄开颜 宛

我校进一步落实 2002 年课题及论文奖励政策

我校科研部近日发出通知，为激励和调动我校科技人员的科研积极性，推动我校科技进步，根据《001 号文件》第一军医大学科技奖励暂行规定，学校将对重点科研课题负责人、高层次论文发表人进行奖励。具体奖项为：

1 课题匹配奖励

2002 年获得的国家自然科学基金重大项目、重点项目、杰出青年科学基金、类别 73 课题按照实际到达我校的资助经费总额的 2% 给予奖励。

2 论文奖励

2002 年在国外期刊公开发表，以学校为第一署名单位的学术研究论文，不包括综述、经验交流、病例报告等。根据刊登期刊最新发布的影响因子进行分类奖励。影响因子 ≥ 20 万元 / 篇；影响因子 < 20 万元 / 篇；影响因子 ≥ 1000 元 / 篇；影响因子 < 1000 元 / 篇；影响因子 ≥ 300 元 / 篇；影响因子 < 300 元 / 篇。

均 辑 宛